

Grado Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Estudio de la interacción de SALL1, causante del Síndrome de Townes-Brocks, con la E3 SUMO ligasa CBX4.

Autor/a: Eukene Landaluze Zulueta
Director/a: Rosa Barrio
Ana María Zubiaga

ÍNDICE

Resumen	2
Introducción.....	2
Hipótesis y Objetivos.....	4
Materiales y Métodos	5
Cultivos celulares.....	5
Plásmidos utilizados en la transfección.....	5
qPCR	5
Ensayo de cicloheximida	6
Ensayo de bioubiquitinación	6
Western blot	7
Análisis estadístico.....	7
Resultados	7
SALL1 influye en los niveles de CBX4 a nivel postranscripcional.....	7
SALL1 influye en los niveles de transcripción de los genes diana de CBX4	8
SALL1 estabiliza CBX4	9
SALL1 reduce los niveles de ubiquitinación de CBX4	10
Discusión.....	12
Conclusiones.....	15
Bibliografía.....	15

1. RESUMEN

SALL1 es un represor transcripcional del tipo dedos de zinc que regula la organogénesis y el desarrollo animal. Las proteínas de la familia SALL sufren modificaciones postraduccionales por miembros de la familia de ubiquitina, como por ejemplo SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifier). Para entender la importancia de esta modificación postraduccional en la interacción de SALL1 con otras proteínas, se analizó la relación de SALL1 con CBX4, siendo ésta una E3 SUMO-ligasa y una subunidad del complejo de represión Polycomb 1 (PRC1). Tanto SALL1 silvestre (WT) como un mutante de SALL1 que no puede ser modificado por SUMO, SALL1 Δ SUMO, interaccionan con CBX4. Observaciones previas del laboratorio sugirieron que la presencia de SALL1 influye en los niveles de CBX4. En este trabajo se ha demostrado que SALL1 no influye en los niveles de CBX4 de manera transcripcional, sino de manera postranscripcional. También se ha demostrado la capacidad de SALL1 para estabilizar a CBX4, haciendo que su ubiquitinación y su degradación se reduzcan. Asimismo, SALL1 contribuye a la represión de los genes diana de CBX4, mientras que SALL1 Δ SUMO no produce el mismo efecto. Estos resultados indican que la SUMOilación de SALL1 es necesaria para aumentar la actividad represora de CBX4, aunque no para su estabilización.

2. INTRODUCCIÓN

La familia SALL (Spalt-like) de factores de transcripción de tipo dedos de zinc tiene un papel fundamental en el desarrollo animal. Estas proteínas están conservadas en diferentes organismos, desde *C. elegans* a vertebrados. En humanos existen cuatro ortólogos de SALL (SALL1, SALL2, SALL3 y SALL4), los cuales se caracterizan por una distribución estereotípica de dedos de zinc. El primer dominio de dedos de zinc corresponde al tipo C2HC y solo está presente en vertebrados, mientras que el resto de los dominios de dedos de zinc corresponden al tipo C2H2. Otro dominio importante es la región rica en glutamina (poly-Q), la cual está involucrada en la interacción de SALL con otras proteínas (1). Las proteínas SALL tienen un papel importante en el desarrollo del tubo neural, en la organogénesis y en el desarrollo embrionario (2), por lo que mutaciones en los genes *SALL* pueden dar lugar a enfermedades del desarrollo. Se conocen dos enfermedades hereditarias relacionadas con genes *SALL* humanos, como son el síndrome de Townes-Brocks (TBS), causado por mutaciones en el gen *SALL1* y el síndrome de Okihiro (causado por mutaciones en el gen *SALL4*) (2). TBS es una enfermedad genética autosómica dominante causada por truncamientos de la proteína SALL1 y caracterizada por un espectro de malformaciones en extremidades, estenosis anal, sistema auditivo y riñones, entre otras (3,4).

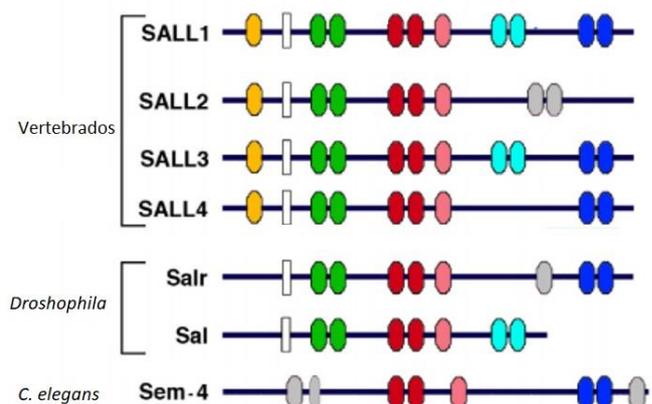


Figura 1. Representación gráfica de las proteínas SALL en diferentes organismos. Los dominios se conservan desde *C.elegans* hasta vertebrados. Los círculos hacen referencia a los dedos de zinc y el cuadrado blanco a una región rica en glutamina. ``Adaptado de (2)``

SUMO es una molécula similar a ubiquitina que, al igual que ésta, se une a lisinas localizadas en una secuencia consenso mediante la acción de las enzimas E1, E2 y E3 (5,6,7). La SUMOilación puede cambiar las propiedades de las proteínas diana, como por ejemplo su localización o su interacción con otras proteínas. Tanto en vertebrados como en *Drosophila*, los factores de transcripción SALL pueden ser modificados mediante SUMOilación. En el caso de *Drosophila*, la SUMOilación de las proteínas Sall influye en su localización nuclear y en la regulación de sus genes diana durante el desarrollo del ala (8). Por lo tanto, teniendo en cuenta la conservación evolutiva de la familia SALL se puede hipotetizar que esta modificación postraduccional puede también cumplir un papel importante en vertebrados. Se ha demostrado que la estabilidad, la localización celular y la actividad transcripcional de SALL4 es regulada por la SUMOilación (9). Es pues de gran interés que se sigan estudiando las modificaciones postraduccionales de estas proteínas y se analicen sus consecuencias funcionales.

En estudios previos del laboratorio, se estudió la interacción de SALL1 con otros factores celulares (4). Se realizó un experimento de proteómica de proximidad o BioID en combinación con espectrometría de masas. Los resultados analizados mediante análisis de ontología génica mostraron que entre los grupos de factores enriquecidos, se encontraba el grupo de las SUMO E3 ligasas, como son CBX4 (Chromobox 4), PIAS1, PIAS2 y PIAS4, pudiendo ser alguna de estas la SUMO E3 ligasa involucrada en la SUMOilación de SALL1 *in vivo*. La proteína CBX4 pertenece al grupo de proteínas Polycomb (Pc) (10). Dado que se conocía previamente la interacción genética entre los genes *sall* y *Pc* en *Drosophila* durante el desarrollo embrionario (11), se pensó que sería interesante analizar la interacción entre SALL1 y CBX4 en humanos. CBX4 además de ser una SUMO E3 ligasa, es un componente crítico del complejo de represión Polycomb 1 (PRC1), el cual actúa junto con el complejo de represión Polycomb 2 (PRC2) silenciando la expresión de los genes diana mediante la modificación de histonas (10,12,13).

Las proteínas Pc son represores transcripcionales esenciales para el desarrollo de los organismos, y pueden estar desreguladas en algunas enfermedades humanas (14). Los complejos represores PRC1 y PRC2 compactan la cromatina, silenciando así la transcripción de los genes diana y creando cuerpos nucleares. Estos complejos regulan la estructura de la cromatina a diferentes niveles, modificando las histonas, compactando la cromatina local y regulando la formación de bucles entre regiones reguladoras.

El complejo PRC2 cataliza la trimetilación de la histona 3 en la lisina 27 mediante la acción de la metiltransferasa Ezh2 (15). Esta marca de la histona 3 es reconocida por la forma SUMOilada de CBX4, siendo ésta parte del complejo PRC1. Como consecuencia, RING1 (una subunidad del complejo PRC1) ubiquitina la lisina 119 de la histona 2A (H2A) mediante su actividad E3 ligasa, de manera que se promueve la unión de la histona 1 (H1) al nucleosoma, produciendo la compactación de la cromatina (16,17,18).

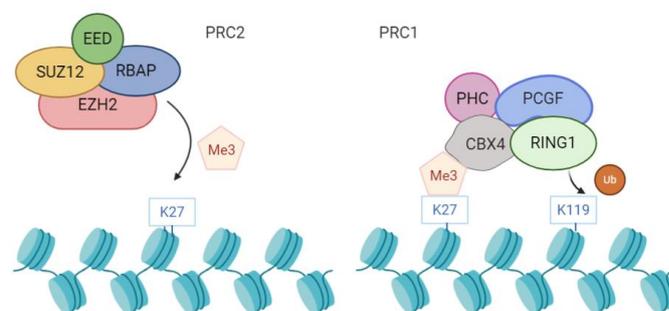


Figura 2. Representación gráfica de las modificaciones por los complejos PRC1 y PRC2 en la cromatina. CBX4 forma parte del complejo PRC1.

La SUMOilación de las proteínas que forman parte del grupo Pc (PcG) es funcionalmente relevante para el silenciamiento de sus genes diana (19). Por ejemplo, CBX4 es un gen diana de la de-SUMOilasa -SENP2- (SUMO-Specific Protease 2) *in vivo* y la SUMOilación de CBX4 es necesaria para la represión de sus genes diana, de manera que en ausencia de SENP2 hay una mayor represión de Gata4 y Gata6 (20). Además de la SUMOilación, CBX4 también puede ser modificada por ubiquitina, siendo la ubiquitinación de CBX4 una señal para su degradación vía ubiquitina/proteasoma.

En este trabajo se ha contribuido a la caracterización de la relación funcional entre SALL1 y CBX4.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Resultados preliminares obtenidos en el laboratorio mostraron la interacción de CBX4 con SALL1 WT, así como con un mutante de SALL1 que no puede ser modificado por SUMO, SALL1 Δ SUMO. Además, un aumento en los niveles de proteína SALL1 producía un aumento de CBX4, así como un aumento en el número y en el tamaño de cuerpos nucleares de CBX4 o "Pc bodies". Por ello **se planteó la hipótesis** de que SALL1 podría ser un agente estabilizador de CBX4. Por lo tanto, el **objetivo principal** de este trabajo fue analizar el papel de SALL1 en la estabilidad de CBX4 y su capacidad reguladora de transcripción. Se plantearon los siguientes **objetivos** específicos:

1. **Comprobar si el efecto de SALL1 sobre los niveles de CBX4 ocurre a nivel transcripcional o postranscripcional.**

Se analizó si el aumento en los niveles de SALL1 conlleva el aumento de los niveles de proteína CBX4. Se analizó también si cambios en los niveles de CBX4 eran debidos a un aumento de la transcripción del gen en presencia de SALL1. Mediante PCR cuantitativa (qPCR), se analizó si la transcripción del gen *CBX4* aumenta con la sobre-expresión de SALL1. Para ello se utilizó un vector inducible lentiviral TripZ con el cual, mediante el sistema Tet-On, se indujo la síntesis de la proteína SALL1 en presencia de concentraciones crecientes de doxiciclina.

2. **Analizar el efecto de SALL1 en la transcripción de los genes diana de CBX4.**

Se analizó si los cambios en los niveles de CBX4 en presencia de SALL1 tenían un efecto en la transcripción de genes diana de CBX4 reportados en la literatura. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para esos genes y se analizó su expresión en líneas celulares mediante qPCR.

3. **Analizar el efecto de SALL1 sobre la ubiquitinación de CBX4 y su degradación por el proteasoma.**

Se analizaron los cambios en la vida media de CBX4 en presencia de SALL1 o SALL1 Δ SUMO mediante un tratamiento con cicloheximida. Se estudió el efecto de SALL1 WT sobre los niveles de ubiquitinación de CBX4 en presencia y ausencia de un inhibidor de proteasoma, MG132, para lo que se utilizó el sistema bioUbiquitina (bioUb).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos Celulares

Las líneas celulares HEK293FT WT y modificadas, se cultivaron en un medio completo (DMEM, Gibco), complementado con 10% de Suero Bovino Fetal (FBS, Gibco) y con 1% de penicilina y estreptomina (pen/strep, Gibco) a 37°C y en una atmósfera con un 5% de CO₂. La línea celular inducible HEK293_TripZ_SALL12XHA_puro se generó mediante la transfección estable del vector lentiviral TripZ y, a través de este sistema se pudo modular la expresión de SALL1 de manera doxiciclina-dependiente. Antes de plaquear cada experimento se contaron las células en la cámara de Neubauer, cargando 10 µl de cada cultivo.

En la línea celular inducible HEK293_TripZ_SALL12XHA_puro la síntesis de SALL1 se reguló por el mecanismo Tet-On; en ausencia de doxiciclina (un antibiótico perteneciente al grupo de las tetraciclinas), el factor de transcripción rtTA no se puede unir al promotor del gen de interés (en este caso el promotor del vector TripZ), y por lo tanto, no se induce la síntesis de SALL1. Sin embargo, en presencia de doxiciclina, ésta se une a rtTA creando un complejo capaz de unirse al promotor, lo cual induce la síntesis de SALL1.

Plásmidos utilizados en la transfección

Se preparó el DNA de los plásmidos utilizados en cada procedimiento. Para ello se transformaron las bacterias (*E. coli*) y se amplificaron dichos plásmidos. Se descongelaron las bacterias competentes XL10 Gold para su transformación, durante 15 minutos en hielo. El choque térmico se realizó a 42°C durante 90 segundos, tras el cual se mantuvieron las células dos minutos en hielo. Se añadieron 500 µl de medio LB (Luria Broth) sin antibiótico y se incubaron durante media hora a 37°C. Se sembraron las bacterias en una placa de LB con el antibiótico pertinente para seleccionar las bacterias transformadas. Se incubaron las placas toda la noche a 37°C. Al día siguiente se inoculó una colonia aislada en un Erlenmeyer con 50 ml de LB suplementado con el antibiótico indicado y se incubó toda la noche con agitación a 37°C. Se centrifugó el cultivo a 3500 rpm durante 20 minutos a 4°C. El pellet se procesó utilizando el kit de extracción de plásmidos (Qiagen) y siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Una vez obtenido el DNA, éste se secó durante 10 minutos y se resuspendió en buffer TE o en agua. Finalmente, mediante el programa ND100 se midió la densidad óptica del plásmido para calcular la concentración del DNA.

qPCR

Para los análisis de qPCR, las células HEK293FT se transfectaron con 5 µg de los plásmidos *CMV-SALL1-YFP*, *CMV-SALL1ΔSUMO-YFP* o *CMV-EGFP-β-Galactosidasa* (β-Gal) mediante el método de fosfato de calcio. SALL1ΔSUMO es un mutante de SALL1 que no puede ser SUMOilado, en el que se sustituyeron las lisinas de las secuencias consenso de SUMOilación por argininas. La línea celular HEK293_TripZ_SALL12XHA_puro se indujo mediante diferentes concentraciones de doxiciclina. Después de 48 horas desde la transfección (en el caso de las células HEK293FT) o de 72 h desde la inducción (en el caso de las células HEK293_TripZ) se aisló el RNA total de las células mediante el kit E.Z.N.A.® Total RNA (Omega). Se cuantificó la cantidad de RNA mediante el espectrofotómetro Nanodrop (ND-1000). Los cDNAs

se prepararon usando el ``SuperScript III First-Strand Synthesis System`` (Invitrogen) en 20 μ l de volumen por reacción y usando el siguiente protocolo: 25°C durante 5 minutos, 42°C durante 30 minutos, 85°C durante 5 minutos. La qPCR se realizó usando PerfeCTa SYBR Green SuperMix Low Rox (Quantabio). Las reacciones se realizaron en 20 μ l, añadiendo 5 μ l de cDNA (100 ng) y 5 μ l de cada primer (10 μ M) en un termociclador CFX96 (BioRad) y siguiendo el siguiente protocolo: 95°C durante 5 minutos y 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 56°C o 62°C durante 30 segundos y 72°C durante 20 segundos. Se realizó el análisis de la curva de fusión por los pares de primers entre 65°C y 95°C, incrementando 0,5°C cada 5 segundos. La expresión de los genes se analizó utilizando el método $\Delta\Delta$ Ct. Primero, a todos los valores Ct (*threshold cycle*: ciclos que necesita la señal de fluorescencia para superar el umbral) se les restó el valor de Ct del gene ``housekeeping`` que en nuestro caso fue GAPDH para obtener el valor Δ Ct. Para calcular el valor $\Delta\Delta$ Ct, se restó a los valores Δ Ct de los genes de interés el valor Δ Ct del gen control experimental. En el caso de las células HEK293FT se utilizó β -Gal como control y en la línea celular HEK293_TripZ como valor control se utilizaron las condiciones sin doxiciclina. Finalmente, se calculó el *fold change* $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que es el valor que se muestra en los resultados. Las reacciones se hicieron en duplicados y los resultados derivaron de cinco experimentos independientes.

Ensayo de Cicloheximida

Se sembraron 3×10^5 células HEK293FT por pocillo en una placa de 6 pocillos. Cuatro horas después se transfectaron las células mediante el método del fosfato cálcico con 2 μ g de los plásmidos *CMV-SALLI-YFP*, *CMV-SALLI Δ SUMO-YFP* o *CMV-EGFP- β -Gal*. Las células se trataron con 50 μ g de cicloheximida y se incubaron durante distintos tiempos (0h, 4h, 8h y 16h). La mitad de las muestras se trataron con 10 μ M de MG132. A continuación, las células se lisaron en el tampón RIPA (Cell Signalling, 20 mM TrisHCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% ácido desoxicólico y 1 mM EGTA) y se analizaron mediante Western blot.

Ensayo de bioUbiquitinación

Se sembraron 3×10^6 células HEK293FT por condición en una placa de 10 cm. Aproximadamente 4 horas después, se transfectaron las células con 3 μ g de cada uno de los siguientes plásmidos en combinaciones específicas: *CMV-SALLI-YFP*, *CMV-SALLI Δ SUMO-YFP*, *CMV-EGFP- β -Gal*, *LL-CMV-BirA-2A-puro* (llamado a partir de ahora BirA), *LL-CMV-BirA-2A-bioUb-puro* (llamado a partir de ahora BirA-bioUb, Figura 3) y *CB6-CBX4-HA*. Asimismo, se realizó este ensayo en la línea celular HEK293_TripZ_SALL12XHA_puro en ausencia y presencia de doxiciclina. Se sembraron 3×10^6 células y la transfección se realizó con los siguientes plásmidos: *LL-CMV-BirA-2A-puro*, *LL-CMV-BirA-2A-bioUb-puro* y *CB6-CBX4-YFP*. En ambas líneas celulares, 16 horas después de la transfección, el medio celular se complementó con biotina (50 μ M) y, 24 horas después, algunas placas se trataron con 10 μ M de MG132 durante la noche. Las células se recogieron pasadas 48 horas desde la transfección, se lavaron con un tampón fosfato salino (PBS: 1 mM KH₂PO₄, 155 mM NaCl y 3 mM Na₂HPO₄·7H₂O) y se recogieron en 0.5 ml de un tampón de lisis WB5 (8 M urea, 1% SDS en 1x PBS) complementado con un inhibidor de proteasas y NEM por cada placa de 10 cm. Las muestras se sonicaron y se centrifugaron a temperatura ambiente. Los lisados celulares se incubaron durante toda la noche con 30 μ l de resina de NeutrAvidin-agarosa (Thermo Scientific) en un agitador orbital. Al día siguiente, se centrifugaron

las muestras a 2000 g durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Después se lavaron las muestras con los siguientes tampones de lavado (WB), todos ellos preparados en 1xPBS: WB1 (8 M urea, 0.25% SDS); WB2 (6M Guanidine-HCl); WB3 (6.4 M urea, 1 M NaCl, 0.2% SDS), WB4 (4M urea, 1 M NaCl, 10% isopropanol, 10% etanol y 0.2% SDS); WB5 y WB6 (2% SDS). Para la elución de las proteínas biotiniladas, las muestras se hirvieron a 95° durante 5 minutos en 50 µl de tampón de elución (4x Laemmli buffer, 100 mM DTT). La resina se separó mediante centrifugación (18000 x g, 5 minutos). Las muestras se analizaron mediante Western blot.



Figura 3. Representación esquemática de la construcción BirA-bioUb.

Western Blot

Las células se lisaron en tampón RIPA complementado con inhibidores de proteasas (Roche) y manteniendo las muestras en hielo, o en tampón de lisis WB5. Se centrifugaron los lisados a 16.400 rpm durante 20 minutos a 4°C o a temperatura ambiente (RT), y se recogieron los sobrenadantes.

Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 7.5% y se corrieron a 90 V. Después se hizo la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa a 90 V durante 90 minutos, manteniéndola en frío. Una vez realizada la transferencia se tiñó la membrana con Ponceau para asegurar que la transferencia había funcionado correctamente. A continuación, se bloqueó la membrana con 5% de leche en polvo desnatada en 1x PBS y 0,1% Tween-20 durante una hora. Los anticuerpos primarios se incubaron durante la noche a 4°C y los anticuerpos secundarios durante 1h a RT. Para la detección de las proteínas de interés se utilizaron diferentes anticuerpos primarios: anti-CBX4 (1:1000, Proteintech), anti-actina (1:1000, Sigma), anti-SALL1 (1:1000, R&D), anti-GFP (1:1000, Roche), anti-Vinculina (1:1000, Cell Signaling), anti-BirA (1:1000, Sino Biological Inc.), anti-AviTag (1:1000, GeneScript) y anti-GAPDH (1:1000, Proteintech). Luego se añadieron los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón marcados con HRP (1:5000, Jackson Immunoresearch). Para poder visualizar la señal de los anticuerpos se utilizó Clarity ECL (BioRad) y el revelador iBrightCL1000 de Invitrogen (Life Technology). La cuantificación de las bandas del Western blot se llevó a cabo mediante el programa ImageJ y se normalizó teniendo en cuenta el control de carga.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Graphpad 7.0. Los resultados obtenidos se analizaron con el test de normalidad Shapiro-Wilk y el test de varianza Levene. Para comparar dos grupos se utilizó la prueba de Mann Whitney. En el caso de los experimentos donde se compararon más de dos grupos de muestras se emplearon Two-Way ANOVA y el test de comparación múltiple Kruskal-Wallis. Se consideraron significativos los valores de p menores a 0,05. En las gráficas, p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***)

5. RESULTADOS

SALL1 influye en los niveles de CBX4 a nivel postranscripcional

Observaciones previas del laboratorio indicaron que los niveles de la proteína CBX4 aumentan con la sobreexpresión de la proteína SALL1. Dado que SALL1 es un regulador transcripcional, el aumento de CBX4 podría deberse a un cambio en sus niveles de transcripción. Se analizaron los niveles de mRNA de CBX4 en condiciones crecientes de expresión de SALL1 en la línea celular HEK293_TripZ_SALL12XHA_puro de manera dependiente de doxiciclina.

Las observaciones iniciales del laboratorio se corroboraron mediante este sistema: los niveles de proteína CBX4 endógena aumentaron significativamente en presencia de concentraciones crecientes de SALL1 (Figura 4 y 5). Mediante el análisis por qPCR se comprobó que los niveles de mRNA de CBX4 no varían significativamente cuando aumenta la expresión de SALL1 (Figura 6). Por lo tanto, se puede concluir que el efecto de SALL1 sobre CBX4 no es a nivel transcripcional sino a nivel postranscripcional.

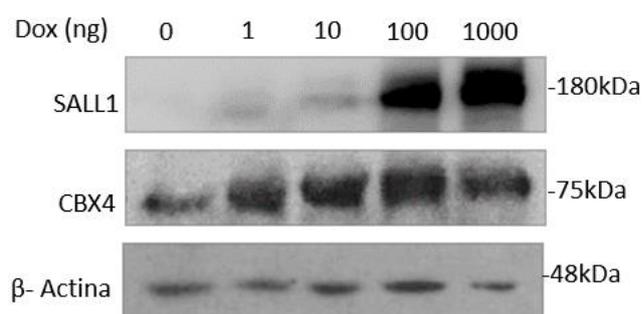


Figura 4. La sobre-expresión de SALL1 aumenta los niveles de proteína CBX4. Mediante el vector inducible lentiviral TripZ se puede observar que en presencia de concentraciones crecientes de doxiciclina, tanto los niveles de proteína SALL1 como los de CBX4 aumentan. Los anticuerpos utilizados se muestran a la izquierda. Los marcadores de peso molecular se muestran a la derecha.

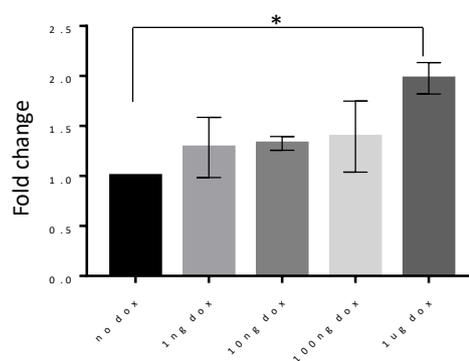


Figura 5. Los niveles de CBX4 aumentan de manera significativa en presencia de SALL1. La gráfica representa los valores y el análisis estadístico mediante el programa Graphpad 7.0 de los valores de CBX4 obtenidos en 3 repeticiones independientes de los experimentos mostrados en la Figura 4. El análisis estadístico se realizó con el test de comparación múltiple Kruskal-Wallis; n=3.

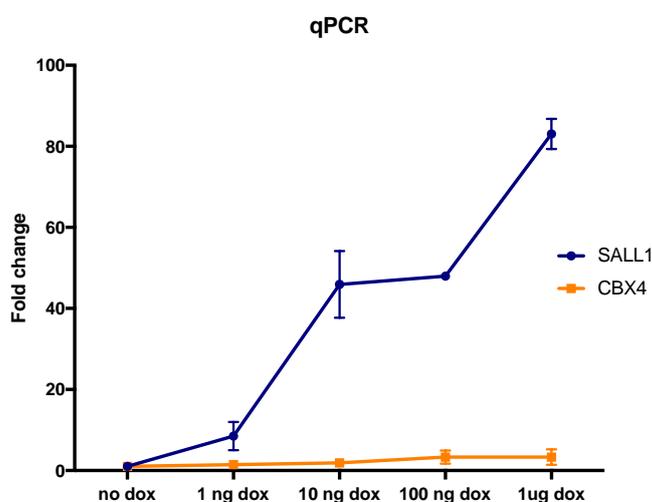


Figura 6. Efecto de SALL1 sobre la transcripción de CBX4. Mediante el vector inducible lentiviral TripZ se puede observar como en presencia de concentraciones crecientes de doxiciclina los niveles de mRNA de SALL1 aumentan mientras que los de CBX4 no varían significativamente.

SALL1 influye en los niveles de transcripción de los genes diana de CBX4

Dado que SALL1 influye en los niveles de CBX4, se planteó la hipótesis de que pudiera tener un papel en la represión de los genes regulados por CBX4. Para comprobar esta hipótesis, se analizó la transcripción mediante qPCR de algunos genes diana de CBX4 (*Hoxa11*, *Hoxb4*, *Hoxb7*, *Hoxb13*, *Hoxc6*, *Hoxc10*, *Hoxc12*, *Hoxd13* y *GATA4*), sobreexpresando tanto SALL1 WT como SALL1 Δ SUMO. Los resultados mostraron que varios de los genes diana de CBX4 analizados, concretamente *Hoxb4*, *Hoxb13*, *Hoxc6*, *Hoxc10* y *GATA4*, se expresaban significativamente menos en presencia de SALL1 WT. Esto indica que SALL1, de alguna manera, aumenta la capacidad represora de CBX4 (Figura 7).

Además, atendiendo a la cuantificación de los resultados, se observó que para que SALL1 contribuya a la represión de CBX4, es necesario que esté SUMOilado: en las células transfectadas con SALL1 Δ SUMO el nivel transcripcional de los genes diana de CBX4 no varía significativamente.

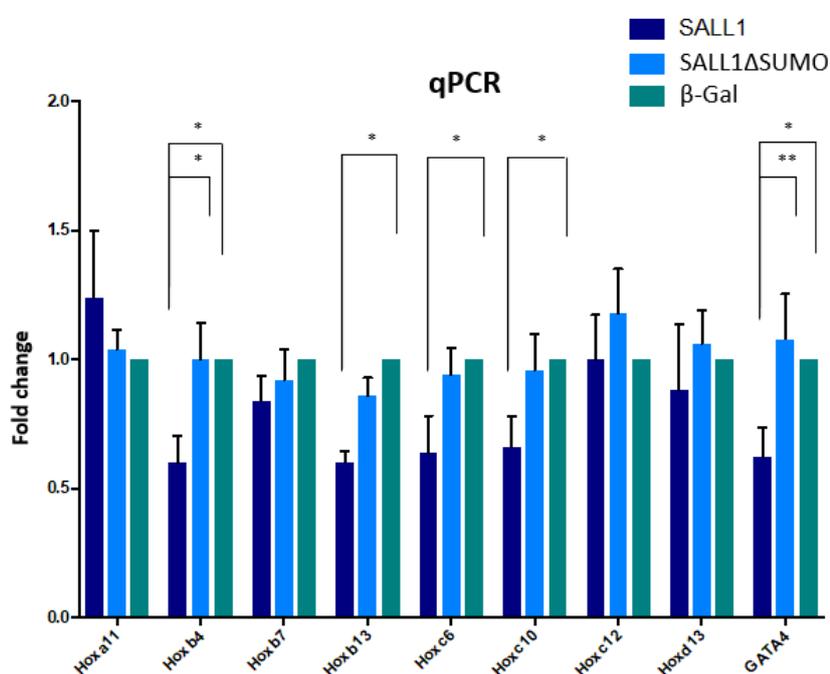


Figura 7. SALL1 contribuye a la represión por CBX4. Representación gráfica de los datos conseguidos de la qPCR en 5 réplicas independientes. Se aprecian diferencias significativas en la expresión de los genes *Hoxb4*, *Hoxb13*, *Hoxc6*, *Hoxc10* y *GATA4*. Estos datos se analizaron con la estadística Two-Way ANOVA; n=5.

SALL1 estabiliza CBX4

Dado que los niveles de la proteína CBX4 aumentan en presencia de SALL1, se planteó la posibilidad de que SALL1 estabilizara a CBX4 retrasando su degradación. Para probar esta hipótesis, se trataron las células con cicloheximida, una droga que inhibe la síntesis de proteínas *de novo*. De esta manera, se puede analizar la vida media de una proteína sin la contribución de nueva síntesis de dicha proteína. Las células se transfectaron con *SALL1-YFP*, *SALL1 Δ SUMO-YFP* o *β -Gal-EGFP* y se trataron con cicloheximida durante diferentes tiempos. Cada experimento se realizó en duplicado, tratándose la mitad de las células con el inhibidor del proteasoma MG132.

Se observó que en las células tratadas con cicloheximida durante 8 ó 16 horas, en ausencia de MG132, la vida media de CBX4 se alarga por la sobreexpresión de SALL1 (Figura 8A y 8C). Estos datos sugirieron que SALL1 estabiliza CBX4. Además, estos resultados fueron similares en presencia de SALL1 Δ SUMO. El efecto observado concuerda con el obtenido previamente en el laboratorio, en que la sobreexpresión tanto de SALL1WT como de SALL1 Δ SUMO aumenta los niveles de CBX4.

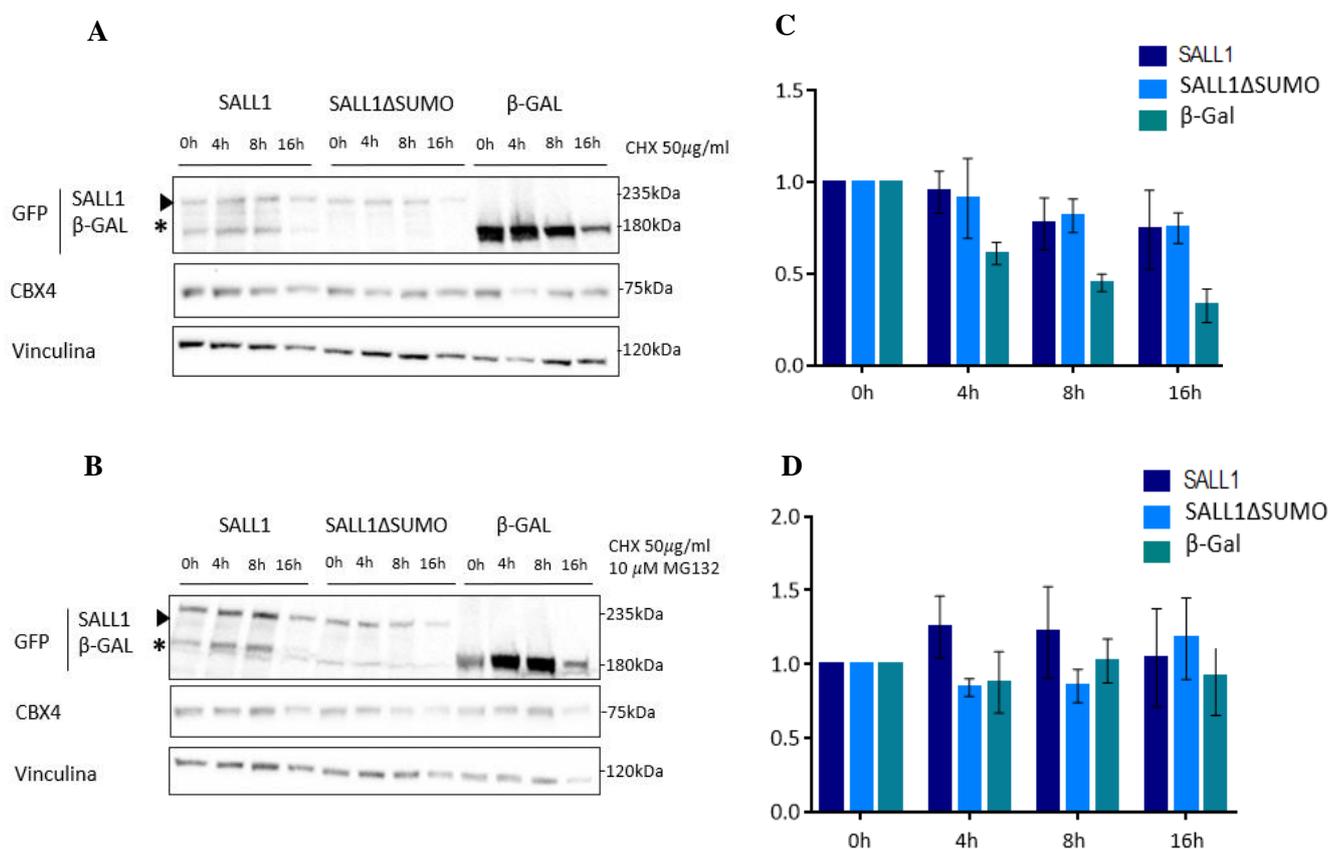


Figura 8. SALL1 estabiliza CBX4. (A,B) Western blot en ausencia (A) o en presencia (B) de MG132 mostrando los niveles de CBX4 endógeno en células tratadas con cicloheximida (CHX) durante 0, 4, 8 ó 16 horas. (C,D) Representación gráfica y análisis estadístico de los niveles de CBX4 a lo largo del tiempo en las tres condiciones indicadas sin (C) o con (D) MG132. Los datos se analizaron con la estadística Two Way ANOVA; n=5. Los resultados indican que la sobreexpresión de SALL1 incrementa la vida media de CBX4.

SALL1 reduce los niveles de ubiquitinación de CBX4

Dado que CBX4 se degrada vía ubiquitina/proteasoma, y que la sobreexpresión de SALL1 aumenta su vida media, se analizó el efecto de SALL1 sobre la ubiquitinación de CBX4 mediante el sistema bioUb. Este sistema se basa en la captura de proteínas ubiquitinadas mediante una resina de estreptavidina, siendo las proteínas modificadas identificadas mediante Western blot.

Se transfectaron las células con los plásmidos *BirA* o *BirA-bioUb* (Figura 9). De este modo, gracias a los lugares donde la traducción ribosomal produce un salto de manera que no haya unión peptídica entre las dos proteínas (2A) en las células se expresaron dos proteínas: bio-Ub y BirA. Se añadió biotina al medio, y de este modo, en presencia de biotina, BirA biotiniló la ubiquitina por reconocimiento de la secuencia de afinidad "bio"

o AviTag. La resina de estreptavidina capturó la biotina de las proteínas biotiniladas, y por lo tanto, todas las proteínas que fueron ubiquitinadas con bio-Ub.

Se realizó este experimento en las células HEK293FT transfectadas con los plásmidos que expresan SALL1 WT, SALL1ΔSUMO o β-Gal, además de *CBX4-HA* y *BirA* o *BirA-bioUb* (Figura 9). Los resultados mostraron la ubiquitinación de CBX4 en presencia de BirA-bioUb, pero la variabilidad entre experimentos fue muy alta.

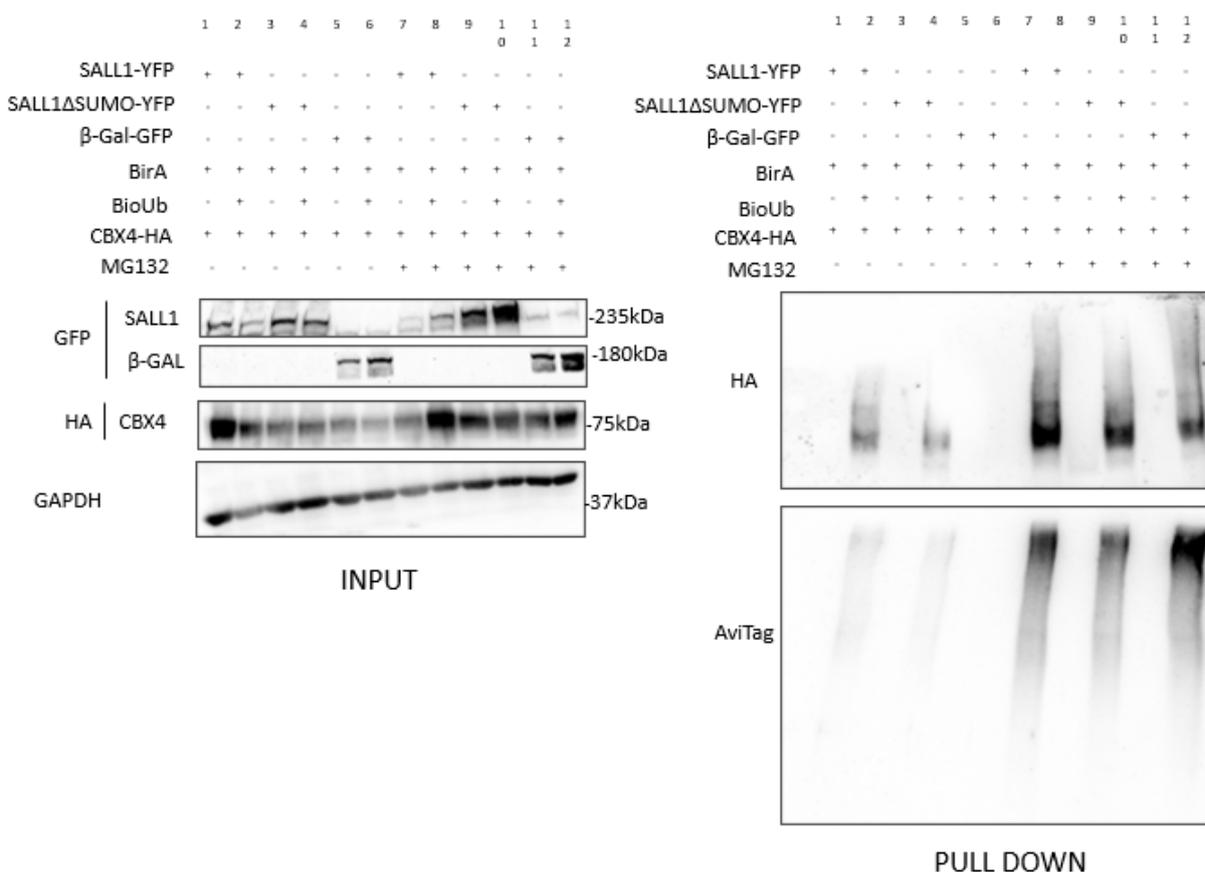


Figura 9. CBX4 es ubiquitinado mediante el sistema bioUb. Western blot que muestra los resultados del ensayo bioUb realizado en las células HEK293FT. El *Input* revela el nivel de proteínas totales presentes en el extracto, mientras que el *Pull down* muestra las proteínas ubiquitinadas. Los anticuerpos utilizados se indican a la izquierda y los pesos moleculares a la derecha. Anti-HA revela CBX4 ubiquitinado en el *Pull down*.

Para evitar la variabilidad, se decidió utilizar el mismo sistema bioUb en una línea celular en la que no hubiese que realizar transfecciones con múltiples plásmidos, siendo ésta probablemente la fuente de variabilidad.

Se empleó la línea celular HEK293_TripZ_SALL12XHA_puro, la cual permite realizar los mismos experimentos (excepto para SALL1ΔSUMO) sin necesidad de transfectar SALL1. El experimento se realizó en ausencia o presencia de MG132. Todas las células se transfectaron con *CBX4-YFP*, bien con el plásmido *BirA-bioUb* o con *BirA* como control. Se añadió doxiciclina para inducir la síntesis de SALL1 (Figura 10).

La cuantificación de 4 experimentos independientes mostró que la sobreexpresión de SALL1 mediante doxiciclina reduce los niveles de ubiquitinación de CBX4 (Figura 10B). Estos resultados indican que el aumento de los niveles de CBX4 en la sobreexpresión de SALL1 puede deberse a una disminución de su ubiquitinación.

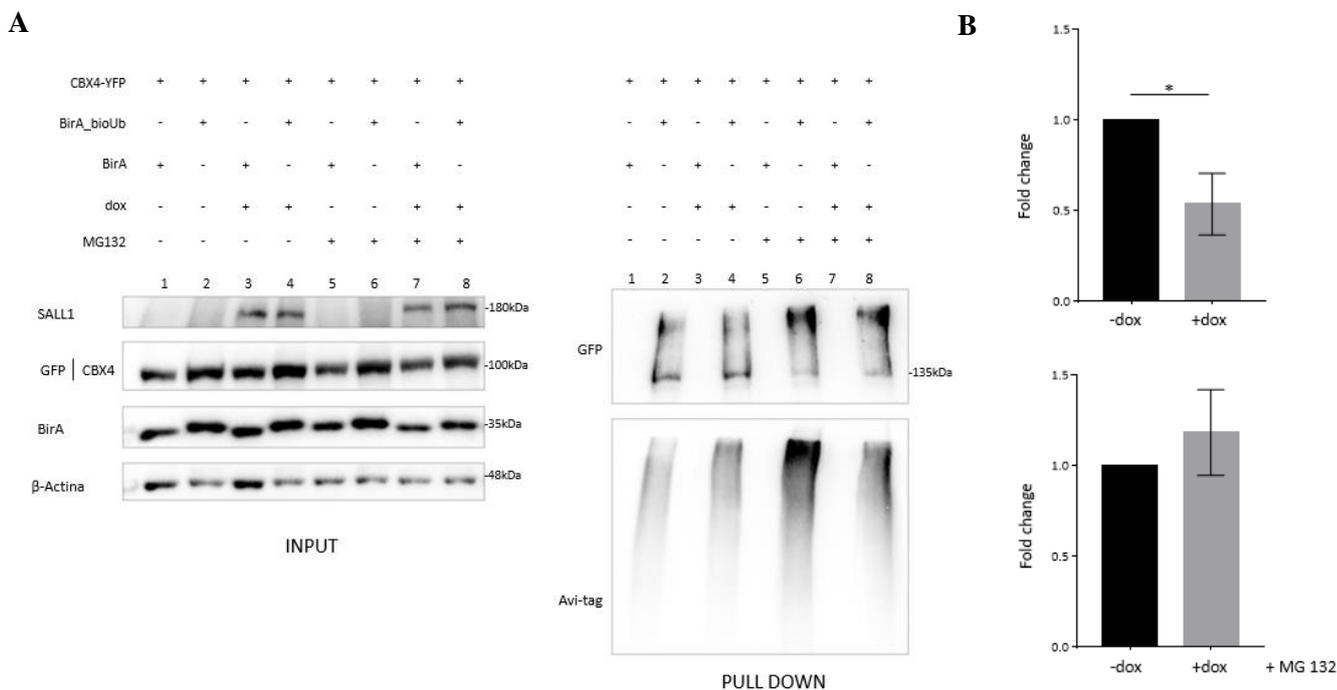


Figura 10. SALL1 reduce la ubiquitinación de CBX4. (A) Resultados del Western blot del ensayo bioUb realizado en la línea celular HEK293_TripZ_SALL12xHA_puro. El *Input* revela el nivel de proteínas totales presentes en el extracto, mientras que el *Pull down* muestra la ubiquitinación de CBX4. Los anticuerpos utilizados se indican a la izquierda y los pesos moleculares a la derecha. (B) Representación gráfica y análisis estadístico de la ubiquitinación de CBX4 en presencia y ausencia de doxiciclina. Los valores de CBX4 ubiquitinado en el *Pull down* se normalizaron por los valores de CBX4 en el *Input*. Los datos se analizaron con la estadística Mann Whitney; n=4.

6. DISCUSIÓN

Las proteínas de la familia SALL son SUMOiladas tanto en vertebrados como en *Drosophila*. Teniendo en cuenta que la SUMOilación de las proteínas Sall en *Drosophila* es fundamental para que éstas cumplan su función en el desarrollo, se consideró interesante analizar en humanos el papel de la SUMOilación de SALL1 en relación a sus proteínas interactoras (8). Además, mutaciones en el gen *SALL1* están relacionadas con el síndrome de Townes-Brocks (4), por lo que entender la regulación de esta proteína es esencial para entender la etiología de esta enfermedad.

Los experimentos realizados previamente en el laboratorio mediante proteómica de proximidad (BioID) y análisis de espectrometría de masas demostraron que entre los interactores de la proteína SALL1 se encuentra la E3 SUMO ligasa CBX4 (4). Se decidió poner la atención en CBX4 porque anteriormente se había observado la interacción genética entre los homólogos de SALL1 y CBX4 en *Drosophila*. Para validar la interacción de la proteína CBX4 con la proteína SALL1, el laboratorio llevó a cabo un ensayo de GFP *pull down* y se corroboró

que SALL1 y CBX4 interaccionan. Además, se comprobó que existe también interacción entre CBX4 y el mutante SALL1 Δ SUMO, lo cual indica que no es necesaria la SUMOilación de SALL1 para su interacción con CBX4. Mediante la técnica de inmunofluorescencia, se confirmó que SALL1 y CBX4 no colocalizan en los cuerpos nucleares. Sin embargo, se demostró mediante el ensayo de *Proximity Ligation Assay* que ambas proteínas co-localizan en el nucleoplasma. Resultados previos del laboratorio mostraron que un aumento de los niveles tanto de SALL1 como de SALL1 Δ SUMO contribuyen a un aumento en los niveles de proteína CBX4, acompañado de un aumento en el número de cuerpos nucleares de CBX4 (puntos de represión de cromatina).

Teniendo en cuenta los resultados mencionados, este trabajo se centró en el análisis del efecto de SALL1 sobre los niveles de CBX4. En primer lugar, aunque experimentos previos demostraron que en presencia de la proteína SALL1 sobre-expresada los niveles de proteína de CBX4 aumentan, se comprobó este efecto en la línea celular HEK293_TripZ_SALL12XHA_puro (Figuras 4 y 5). Se demostró también que el efecto de SALL1 sobre CBX4 no es a nivel transcripcional, ya que el aumento de los niveles de SALL1 no conlleva a el aumento de la transcripción del gen *CBX4* (Figura 6). Por lo tanto, el aumento de CBX4 en presencia de SALL1 se produce postranscripcionalmente y además, los datos indicaron que este efecto puede ser a nivel de una disminución de la degradación de CBX4 vía ubiquitina/proteasoma causada por la reducción de los niveles de ubiquitinación de CBX4 en presencia de SALL1.

Dado que SALL1 aumenta los niveles de la proteína CBX4, y teniendo en cuenta que CBX4 forma parte de PRC1, se analizó la función de SALL1 sobre la capacidad de represión de CBX4. Los resultados mostraron que la mayoría de los genes diana de CBX4 que se analizaron están más reprimidos en presencia de SALL1 (Figura 7). Considerando que CBX4 forma parte de PRC1 y que las proteínas Pc son represores transcripcionales, este resultado demostró que, de alguna manera, SALL1 ayuda a CBX4 a realizar su función como represor. Es interesante destacar que, la SUMOilación de SALL1 parece necesaria para este efecto, ya que en presencia de SALL1 Δ SUMO no se observó una variación significativa en los niveles de represión de los genes diana de CBX4. Por lo tanto, SALL1 solo tiene ese efecto funcional cuando está SUMOilada.

Todos los resultados anteriores plantean la posibilidad de que SALL1 de alguna manera estabiliza a CBX4. Por ello se analizó la vida media de CBX4 mediante el tratamiento de cicloheximida. Así se concluyó que la sobre-expresión de SALL1 hace que la vida media de CBX4 sea más larga (Figura 8C). Además, teniendo en cuenta que tanto SALL1 como SALL1 Δ SUMO aumentan los niveles de CBX4, el efecto de estas dos proteínas sobre la estabilidad de CBX4 podría ser similar. Los resultados mostraron que, tal y como se esperaba, tanto SALL1 como SALL1 Δ SUMO tienen la capacidad de estabilizar a CBX4. Por lo tanto, no es necesaria la SUMOilación de SALL1 para la estabilización de CBX4.

Por último, se sabe que CBX4 se degrada vía ubiquitina/proteasoma ya que en presencia del inhibidor del proteasoma MG132 los niveles de CBX4 aumentan. Es decir, en presencia de MG132 hay una acumulación de proteína debido a que la degradación vía ubiquitina/proteasoma está disminuida. En base a estos resultados, se analizó el papel de SALL1 sobre la ubiquitinación de CBX4 mediante el experimento de bioUb. En un inicio se empleó la línea celular HEK293FT, pero la variabilidad en la eficiencia de transfección no permitió llegar a

una conclusión clara en cuanto a la ubiquitinación de CBX4 en diferentes condiciones. Por lo tanto, se empleó la línea celular HEK293_TripZ_SALL12XHA_puro para reducir la variable de la transfección. Sin embargo, esta nueva estrategia no permitió analizar el efecto de SALL1 Δ SUMO sobre la ubiquitinación de CBX4. Para poder interpretar correctamente los resultados de estos experimentos, los niveles de CBX4 ubiquitinado presentes en el *Pulldown* se normalizaron respecto a los niveles de CBX4 en el *Input*. La cuantificación de los resultados demostró que la inducción de SALL1 conlleva una disminución en la ubiquitinación de CBX4 (Figura 10B).

En este experimento de bioUb se analizó la ubiquitinación total de CBX4, incluyendo la ubiquitinación en diferentes lisinas, la monoubiquitinación, la poliubiquitinación, las cadenas de ubiquitinación mixtas, etc. Teniendo en cuenta que cada uno de estos tipos de ubiquitinación conlleva una función diferente, sería interesante analizar qué tipo de cadenas de ubiquitina están siendo alteradas por SALL1 (21). Sin embargo, dado que la función predominante de la ubiquitinación es la señalización de degradación del sustrato, y considerando que CBX4 puede degradarse vía ubiquitina/proteasoma, se puede hipotetizar que SALL1 actúa sobre la disminución de cadenas de lisina 48 en la ubiquitinación de CBX4, ya que estas cadenas son las asociadas a la degradación. Para investigar el tipo de cadenas modificadas por SALL1 se requerirían experimentos adicionales, como por ejemplo emplear anticuerpos específicos que reconozcan las cadenas de ubiquitinas en lisina 48.

La presencia de SALL1 conlleva una menor ubiquitinación de CBX4, lo cual reduce su degradación y alarga su vida media. Por lo tanto, SALL1 estabiliza y aumenta los niveles de proteína CBX4 de manera postranscripcional. Dado que no se conoce una actividad deubiquitinasa para la proteína SALL1, el efecto de SALL1 sobre CBX4 podría ser indirecto y podría ser explicado mediante dos hipótesis diferentes. Por un lado, siendo SALL1 un represor transcripcional podría reprimir la transcripción de una posible E3 ubiquitina-ligasa encargada de ubiquitinar a CBX4. Por otro lado, puede que SALL1 favorezca el reconocimiento de una deubiquitinasa de CBX4, por ejemplo USP26 (22), resultando en una menor ubiquitinación de CBX4 en presencia de SALL1. Serían necesarios experimentos adicionales para poder discernir entre ambas posibilidades. Un posible experimento que se podría realizar para determinar qué posibilidad se adecua mejor al mecanismo de SALL1 sería un GFP *pulldown*. Se podría transfectar la línea celular HEK293_TripZ_SALL12XHA_puro con el plásmido *CBX4-YFP* y analizar en presencia de diferentes dosis de doxiciclina como varía la interacción de CBX4 con USP26 y como varía la señal de USP26 en presencia de cantidades crecientes de SALL1. Se podría emplear un anticuerpo antiGFP para hacer un *pulldown* de CBX4 y analizar la presencia de USP26 mediante Western blot.

Teniendo en cuenta que resultados preliminares del laboratorio mostraron que no existen diferencias significativas en la unión de CBX4 con SALL1 o con SALL1 Δ SUMO, pero que sí existen diferencias en la represión de los genes diana de CBX4 en presencia de SALL1 o de SALL1 Δ SUMO, se puede concluir que la SUMOilación de SALL1 no es necesaria para la unión a CBX4 ni para su estabilización, pero sí es necesaria para que aumente su actividad represora. Se sabe que la SUMOilación de CBX4 es necesaria para cumplir la función represora sobre sus genes diana (*Hox*, *Gata*, *Tbx* y *Sox*), ya que la presencia de la de-SUMOilasa SENP2

reduce la represión de los genes diana de CBX4 (20). Se puede hipotetizar que SALL1 no necesita estar SUMOilada para llevar a cabo su efecto indirecto sobre la ubiquitinación de CBX4 estabilizándola, pero que su SUMOilación es necesaria para facilitar la unión de CBX4 a su E3 SUMO ligasa, aumentando así la SUMOilación de CBX4 y haciéndola más activa.

7. CONCLUSIONES

- El efecto de SALL1 sobre la estabilidad de CBX4 se da a nivel postranscripcional, ya que el aumento en los niveles de SALL1 no conlleva un aumento en la transcripción del gen *CBX4*.

- SALL1 y SALL1 Δ SUMO tienen la capacidad de estabilizar a CBX4, ya que su presencia aumenta la vida media de CBX4.

- En presencia de SALL1, CBX4 tiene mayor capacidad de reprimir sus genes diana, pero este efecto no se muestra en presencia de SALL1 Δ SUMO, es decir, la SUMOilación de SALL1 es necesaria para dicha función represora.

- La ubiquitinación de CBX4 es menor en presencia de SALL1. Se infiere por lo tanto que SALL1 estabiliza a CBX4 impidiendo que ésta sea ubiquitinada.

- En conclusión, la regulación de CBX4 mediada por SALL1 podría ser relevante para controlar la expresión de sus genes diana que participan en el desarrollo animal. La investigación de la naturaleza de la interacción entre SALL1 y CBX4 es fundamental para entender el rol de SALL1 en el desarrollo.

8. BIBLIOGRAFÍA

[1] Lorente-Sorrolla, J., Truchado-García, M., Perry, K.J., Henry, J.Q. y Grande, C. (2018). Molecular, phylogenetic and developmental analyses of Sall proteins in bilaterian. *EvoDevo*, 9(1).

[2] De Celis, J.F. y Barrio, R. (2009). Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *Int. J. Dev. Biol.*, 53, 1385-1398.

[3] Kohlhase, J., Wischermann, A., Reichenbach, H., Froster, U. y Engel, W. (1998). Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nat. Genet.*, 18(1), 81-83.

[4] Bozal-Basterra, L., Martín-Ruiz, I., Pirone, L., Liang, Y., Sigurosson, J.O., Gonzalez-Santamarta, M., Giordano, I., Gabicagogeascoa, E., de Luca, A., Rodríguez, J.A., Wilkie, A.O.M., Kohlhase, J., Eastwood, D., Yale, C., Olsen, J.V., Rauchman, M., Anderson, K.V., Sutherland, J.D. y Barrio, R. (2018). Truncated SALL1 Impedes Primary Cilia Function in Townes-Brocks Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 102(2), 249-265.

[5] Talamillo, A., Barroso-Gomila, O., Giordano, I., Ajuria, L., Grillo, M., Mayor, U. y Barrio, R. (2020). The role of SUMOylation during development. *Biochem. Soc. Trans.*, 48(2), 463-478.

[6] Flotho, A. y Melchior, F. (2013). Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 82, 357-385.

[7] Bannister, A.J. y Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381-395.

- [8] Sánchez, J., Talamillo, A., Lopitz-Otsoa, F., Pérez, C., Hjerpe, R., Sutherland, J.D., Herboso, L., Rodríguez, M.S. y Barrio, R. (2010). Sumoylation Modulates the Activity of Spalt-like Proteins during Wing Development in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, 285(33), 25841-25849.
- [9] Yang, F., Yao, Y., Jiang, Y., Lu, L., Ma, Y. y Dai, W. (2012) Sumoylation Is Important for Stability, Subcellular Localization, and Transcriptional Activity of SALL4, an Essential Stem Cell Transcription Factor. *J. Biol. Chem.*, 287(46), 38600-38608.
- [10] Ogiyama, Y., Schuettengruber, B., Papadopoulos, G.L., Chang, J.-M. y Cavalli, G. (2018). Polycomb-Dependent Chromatin Looping Contributes to Gene Silencing during *Drosophila* Development. *Mol. Cell*, 71(1), 73–88.
- [11] Casanova, J. (1989). Mutations un the spalt gene of *Drosophila* cause ectopic expression of *Ultrabithorax* and *Sex combs reduced*. *Dev. Biol.*, 198, 137-140.
- [12] Entrevan, M., Schuettengruber, B. y Cavalli, G. (2016). Regulation of Genome Architecture and Function by Polycomb Proteins. *Trends Cell Biol.*, 26(7), 511-525.
- [13] Jiao, H.K., Xu, Y., Li, J., Wang, W., Mei, Z., Long, X.D. y Chen, G.Q. (2015). Prognostic significance of Cbx4 expression and its beneficial effect for transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma. *Cell Death & Disease*, 6(3).
- [14] Morey, L. y Helin, K. (2010). Polycomb group protein-mediated repression of transcription. *Trends Biochem. Sci.*, 35(6), 323-332.
- [15] Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S. y Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing. *Science*, 298(5595), 1039-1043.
- [16] Levine, S.S., Weiss, A., Erdjument-Bromage, H., Shao, Z., Tempst, P. y Kingston, R.E. (2002). The Core of the Polycomb Repressive Complex is Compositionally and Functionally Conserved in Flies and Humans. *Mol. Cell. Biol.*, 22(17), 6070-6078.
- [17] Luis, N.M., Morey, L., Mejetta, S., Pascual, G., Janich, P., Kuebler, B., Roma, G., Nascimento, E., Frye, M., Di Croce, L. y Benitah, S.A. (2011). Regulation of Human Epidermal Stem Cell Proliferation and Senescence Requires Polycomb-Dependent and -Independent Functions of Cbx4. *Cell Stem Cell*, 9(3), 233-246.
- [18] Meas, R. y Mao, P. (2015). Histone ubiquitylation and its roles in transcription and DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, 36, 36–42.
- [19] Kagey, M.H., Melhuish, T.A. y Wotton, D. (2003). The Polycomb Protein Pc2 Is a SUMO E3. *Cell*, 113(1), 127-137.
- [20] Kang, X., Qi, Y., Zuo, Y., Wang, Q., Zou, Y., Schwartz, R.J., Cheng, J. y Yeh, E.T.H. (2010). SUMO-Specific Protease 2 Is Essential for Suppression of Polycomb Group Protein- Mediated Gene Silencing during Embryonic Development. *Mol. Cell*, 38(2), 191-201.
- [21] Komander, D. y Rape, M. (2012). The ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.*, 81(1), 203-229.
- [22] Ning, B., Zhao, W., Qian, C., Liu, P., Li, Q., Li, W. y Wang, R.F. (2017). USP26 functions as a negative regulator of cellular reprogramming by stabilizing PRC1 complex components. *Nat. Commun.*, 8(1).